УКРАЇНСЬКИЙ АНТАРКТИЧНИЙ
ЖУРНАЛ
УАЖ № 9, 187-193 (2010)

УДК 780.1

СКРИНІНГ ВІРУСНИХ АНТИГЕНІВ У РОСЛИНАХ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* ТА *COLOBANTHUS QUITENSIS*

С.В. Долгорукова, І.Г. Будзанівська, Ф.П. Дем'яненко, В.П. Поліщук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Володимирська, 64
E-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

Реферат. Пріоритетним напрямком досліджень у фітовірусології є вивчення розповсюдженості вірусів рослин, в тому числі серед антарктичних рослин. Саме тому метою даної роботи є вивчення вірусів рослин і проведення скринінгу вірусних антигенів у рослинах *Deschampcia antarctica* та *Colobanthus quitensis*. Зразки відбиралися з великої кількості островів, серед яких о-ви Ялур, Петерман, Барселот, Галіндез, Бархан, Уругвай, а також з островів Липман, Вінтер, Дарбокс, з мису Расмуссен, мису Туксен. Дослідні зразки були перевірені на наявність вірусів у рослин, серед яких можна виділити вузьке коло рослин-господарів вірусів: мозаїки бромусу (ВМБ, BMV), штрихуватої мозаїки пшениці (ВШМЯ, BaSMV) – та широке коло рослин-господарів-вірусів: огіркової мозаїки (ВОМ, CMV), плямистого в'янення томатів (ВПЗТ, TSWV), мозаїки люцерни (ВМЛ, AMV), смугастої мозаїки пшениці (ВСМП, WSMV), жовтої карликовості ячменю (ВЖКЯ, BYDV), мозаїки цукіні (ВМЦ, ZYMV), аспермії томатів (ВАТ, AMV), мозаїки резухи (ВМР, ArMV), мозаїки пепіно (ВМП,PepMV), зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО, CGMMV), тютюнової мозаїки (ВТМ, TMV), а також X-вірус картоплі (ХВК, PVX) та Y-вірус картоплі (УВК, PVY). За допомогою імуноферментного аналізу встановлено наявність антигенів вірусів, що належать до різних таксономічних груп, а саме ВМЛ (*Alfamovirus*) та ВОМ (*Bromoviridae, Cucumovirus*), ВЗКМО (*Tobamovirus*) та ВПЗТ (*Bunyaviridae, Tospovirus*). Тому, відштовхуючись від отриманих даних, можемо припустити, що Антарктида є великим резервуаром для збереження різноманітніх організмів, у тому числі фітовірусів.

Реферат. Приоритетное направление исследований в фитовирусологии – изучение распространённости вирусов растений, в том числе среди растений антарктических. Именно поэтому цель данной работы – изучение вирусов растений и проведение скрининга антигенов среди растений *Deschampcia antarctica* и *Colobanthus quitensis*. Образцы были отобраны с большого количества островов, а именно: Ялур, Питерман, Барселот, Галиндез, Бархан, Уругвай, а также с островов Липман, Винтер, Дарбокс, мыса Расмуссен, мыса Туксен. Исследуемые образцы проверялись на наличие в них вирусов у растений, среди которых можно выделить узкий круг хозяев вирусов: мозаики костра (BMV), мозаики полоски ячменя (BaSMV) – и широкий круг растений-хозяев вирусов: огуречной мозаики (CMV), пятнистого увядания томата (TSWV), мозаики люцерны (AMV), полосатой мозаики пшеницы (WSMV), жёлтой карликовости ячменя (BYDV), мозаики цуккини (ZYMV), аспермии томатов (AMV), мозаики резухи (ArMV), мозаики пепино (PepMV), зеленой крапчатой мозаики огурца (CGMMV), табачной мозаики (TMV), а также X-вирус картофеля (PVX) и Y-вирус картофеля (PVY). С помощью метода иммуноферментного анализа было подтверждено наличие вирусных антигенов, которые относятся к разным таксономическим группам, а именно AMV-Alfamovirus, CMV-Bromoviridae, Cucumovirus, CGMMV (Tobamovirus) и TSWV (Bunyaviridae,

Tospovirus). Итак, можно предположить, что Антарктида является крупным резервуаром для сохранения разнообразных организмов, в том числе фитовирусов.

Screening of *Deshampsia Antarctica* and *Colobanthus Quitensis* Plants for Viral Agents. S.V. Dolgorukova, I.G. Budzanivska, F.P. Demjanenko, V.P. Polishchuk.
Abstract. Priority research in virology is the study of Antarctic plant viruses, so we can talk about high diversity of antigenic determinants among these plants. Therefore the purpose of this work is the study of plant viruses and the screening of viral antigens in plants Deschampcia antarctica and Colobanthus quitensis. Samples were selected on many islands, including islands of Galindez, Barkhan, Yalour, Pitterman, Uruguay, Skua, Lipman, Barselot, Dorboks, Vinger, and capes Rassmusen and Tuksen. The samples were tested for viruses of plants that have a narrow range of host-plants Brome mosaic virus (BrMV), Barley stripe mosaic hordeivirus (BSMV) and Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) and wide range of host-plants Cucumber mosaic virus (CMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Alfalfa mosaic virus (AMV), Wheat streak mosaic virus (WSMV), Barley yellow dwarf virus (BaYDV), Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), Tomato aspermy virus (TAV), Arabis mosaic virus (ArMV), Pepino mosaic virus (PMV), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Tobacco mosaic virus (TMV), Potato virus X (PVX) та Potato virus Y (PVX). Using ELISA, the presence of viral antigens belonging to different taxonomic groups, such as AMV (*Alfamovirus*) and CMV (*Bromoviridae, Cucumovirus*), CGMMV (*Tobamovirus*) and TSWV (*Bunyaviridae, Tospovirus*) was detected. Therefore, basing on the findings, we suggest that Antarctica is a large reservoir for storing of variety of organisms, including viruses. This in turn makes it a subject of study for many researchers.
Key words: Antarctica, plant viruses, Deshampsia antarctica, Colobanthus quitensis.

Вступ

Антарктида є одним із найкращих і найнезвіданіших місць на нашій планеті. Протягом понад двох сторіч Білий Континент вражав науковців своєю неперевершеною природною красою. Ця земля відкриває свої двері для численних наукових звершень.

У багатьох вчених Антарктида викликає велику кількість питань, в тому числі – звідки там взялися віруси чи як вони туди потрапили. Деякі вчені висувають припущення, що всі віруси Землі були перенесені з Антарктиди, але інші вчені з цим не погоджуються, і це викликає багато дискусій і робить даний континент цікавим для вивчення.

1. Велика увага останнім часом приділяється вивченню вірусів тварин і птахів, які є місцевими жителями Шостого континенту. Оскільки велика кількість тварин представлена пінгвінами, а також чайками та тюленями, то саме до них звернений основний інтерес учених-вірусологів. Зареєстровано випадок специфічного пташиного патогену, infection bursal disease virus (IBDV), у диких антарктичних пінгвінів. Антитіла до вірусу грипу і параміксовірусів також були виявлені в пінгвінах Adelia (Pygoscelis adeliae) і антарктичних поморниках (Stercorarius skua maccormicki) (Amy, Wall, 2001).

На деяких антарктичних станціях було проведено дослідження, які показали розповсюдженість респіраторних захворювань серед працівників станцій. Було детектовано віруси парагрипу та вірус грипу (Pearce, Wilson 2003).

2. Що стосується флори Антарктиди, то на Шостому континенті поширені водорості (*Prasiola cripsa, Desmarestia (brown alga), Cystophaera jacquin*), мохи та лишайники, а серед вищих судинних рослин є лише два види – *Antarctic pearlwort Colobanthus quitensis* та злакова рослина *Deshampsia antarctica*. Обидві рослини схожі за екологічними характеристиками та розповсюдженням. Поширені вони у прибережних зонах Антарктиди і, як правило, асоційовані з угрупованнями, у яких домінують мохи та лишайники, проте *C. quitensis* зустрічається рідше, аніж *D. antarctica*. Популяції цих видів знаходяться під наглядом протягом

довгого часу, починаючи з 1963 року, у кількох місцях Аргентинського архіпелагу (Sneddon, 1999; Holderegger, Stehlik, 2003; Alberdia et al, 2002).

На наш погляд, важливим при дослідженні антарктичних видів рослин є вивчення в них вірусів, які можуть призвести до зменшення популяції цих видів. Дослідники вже говорять про виявлення нового вірусу рослин, а саме вірусу, що уражує рослини *Stilbocarpa polaris* і являє собою бациловидний вірус роду *Badnavirus* (SMBV) (Scotsnicki at al, 2003). Вагомі результати дали дослідження льоду з глибоких шарів вічної мерзлоти за допомогою полімеразної ланцюгової реакції – так, спеціалісти із Сполучених Штатів виявили наявність генетичного матеріалу вірусу з тобамогрупи, а саме вірусу мозаїки томатів (ToMV). (Moss at al, 1988; Rogers at al, 2004; Short and Suttle, 2002).

Вивчення вірусів рослин Антарктиди не є розповсюдженим напрямком досліджень, і саме тому актуальність цієї роботи не викликає сумнівів.

Матеріали та методи досліджень

Робота зосереджувалась на дослідженні зразків двох вищих рослин (*Colobanthus quitensis* та *Deshamcia antarctica*) з УАС Академік Вернадський та найближчих островів архіпелагу, а саме Ялур, Петерман, Берселот, Галіндез, Бархан, Уругвай, а також з островів Липман, Вінтер, Дарбокс, мису Расмуссен, мису Туксен та мису біля гори Waugh і Скуа. Обидві рослини схожі за екологічними характеристиками та поширенням і, як правило, асоційовані з угрупованнями, у яких домінують мох та лишайники (Warshauer at al, 1989). Зразки відбиралися протягом кількох (2005–2009) років українськими антарктичними експедиціями (рис. 1).

А Б

Рис. 1. Рослини *Deshamcia Antarctica* (А) та *Colobanthus quitensis* (Б).

Для виявлення вірусних антигенів було використано метод імуноферментного аналізу у двох модифікаціях – прямому та сандвіч-методі. Були використані поліклональні кролячі антитіла до вірусу тютюнової мозаїки та вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка, отриманої на кафедрі вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка, тест-системи проти Х-вірусу картоплі, вірусів огіркової мозаїки, мозаїки люцерни, плямистого в'янення томатів, мозаїки бромусу, штрихуватої мозаїки пшениці, смугастої мозаїки пшениці, жовтої карликовості ячменю, мозаїки цукіні, аспермії томатів, мозаїки резухи, мозаїки пепіно, зеленої крапчастої мозаїки огірка, тютюнової мозаїки (Asserschleben, Німеччина), а також тест-системи фірми «LOEVE». Аналіз проводили на полістиролових планшетах Labsystem (Crowler, 1995). Статистична достовірність результатів передбачала проведення експерименту у трьох повторах. При постановці імуноферментного аналізу враховувалось стандартне відхилення (Лакин,1980).

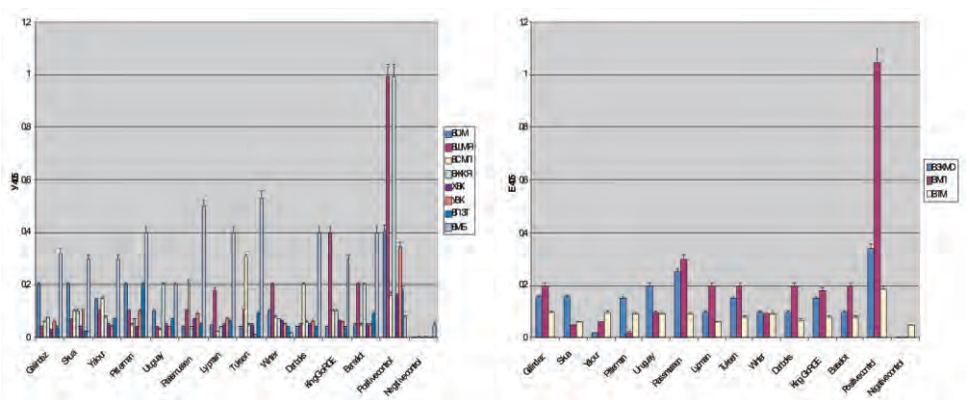
Також було використано метод електронної мікроскопії, а саме метод негативного контрастування, метод листкового зрізу та імуносорбентну електронну мікроскопію (ICEM).

Результати та обговорення

Дана робота передбачала діагностику рослин за допомогою імуноферментного аналізу. Зразки були перевірені на наявність вірусів у рослин, що мають вузьке коло рослин-господарів вірусів: мозаїки бромусу (ВМБ, BMV), штрихуватої мозаїки пшениці (ВШМЯ, BaSMV) – та широке коло рослин-господарів вірусів: огіркової мозаїки (ВОМ,CMV), плямистого в'янення томатів (ВПЗТ,TSWV), мозаїки люцерни (ВМЛ, AMV), смугастої мозаїки пшениці (ВСМП, WSMV), жовтої карликовості ячменю (ВЖКЯ, BYDV), мозаїки цукіні (ВМЦ, ZYMV), аспермії томатів (ВАТ, AMV), мозаїки резухи (ВМР, ArMV), мозаїки пепіно (ВМП, PepMV), зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО, CGMMV), тютюнової мозаїки (ВТМ, TMV), а також Х-вірус картоплі (ХВК, PVX) та Y-вірус картоплі (УВК, PVY).

Перший етап роботи передбачав аналіз зразків рослин *Deshamcia Antarctica* на наявність вірусів злакових, оскільки дана рослина є представником цієї родини. В експерименті було використано наважку 1 г кожного зі зразків, після чого зразки гомогенізувались та центрифугувались при 5000 обертах за хвилину протягом 15 хв. Зразки аналізувалися з використанням антисироваток до таких вірусів: мозаїки бромусу, смугастої мозаїки бромусу, жовтої карликовості ячменю, жовтої мозаїки ячменю, слабкого пожовтіння мозаїки пшениці та вірусу пшениці, що передається через грунт. Виміри проводились на ІФА-рідері фірми Dynatex. За результатами ІФА нами не було виявлено жодного з досліджуваних вірусів. Отже, такі результати свідчать про те, що дані віруси в рослинах *Deschampcia antarctica* в Антарктиді не виявляються.

На наступному етапі було перевірено рослини *Colobanthus quitensis* та *Deshamcia Antarctica* на віруси, не характерні для даних рослин. Рослини було перевірено на наявність таких вірусів: огіркової мозаїки (ВОМ, CMV), плямистого в'янення томатів (ВПЗТ, TSWV), мозаїки люцерни (ВМЛ, AMV), мозаїки цукіні (ВМЦ, ZYMV), аспермії томатів (ВАТ, AMV), мозаїки резухи (ВМР, ArMV), мозаїки пепіно (ВМП, PepMV), зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО, CGMMV), тютюнової мозаїки (ВТМ, TMV), Х-вірус картоплі (ХВК, PVX) та Y-вірус картопл (УВК, PVY). За результатами ІФА можемо говорити про наявність вірусних антигенів до вірусів огіркової мозаїки, плямистого в'янення томатів, зеленої крапчастої мозаїки огірка (рис. 2, 3).



А Б

Рис. 2. Детекція вірусів у рослинах *Deschampcia antarctica* за допомогою сендвіч ІФА (А) та за допомогою непрямого ІФА (В).

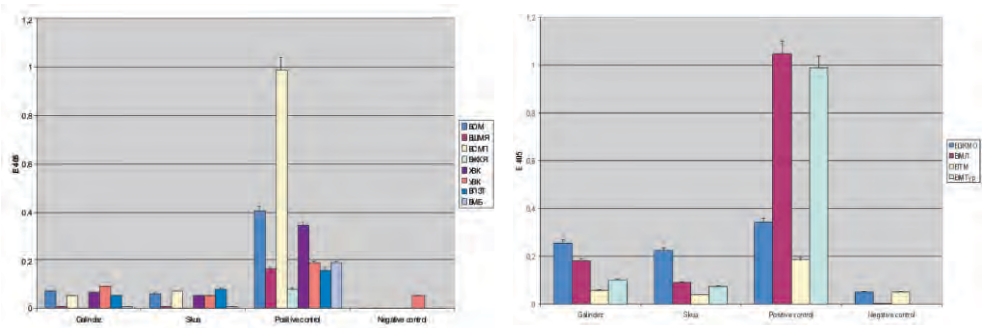
Отримані результати свідчать про наявність у даних рослинах атнигенів вірусів, що належать до різних таксономічних груп, а саме вірусів зеленої крапчатої мозаїки огірка (*Tobamovirus*), огіркової мозаїки (*Bromoviridae, Cucumovirus*) та плямистого в'янення томатів (*Bunyaviridae, Tospovirus*).

Вивчення інфекційності вірусів проводили на рослинах-індикаторах. Рослини були підібрані таким чином, щоб не давати перехресної реакції з кількома вірусами, а саме для ВОМ рослиною-індикатором є *Licopersicon esculentum* (томат), для ВПЗТ – *Tropaeolum majus* (настурція), а для ВЗКМО – *Datura stramonium* (дурман) (табл.1).

Таблиця 1

Рослини-індикатори, що не дають перехресної реакції на дію ВЗКМО, ВОМ, ВПЗТ

Вірус	Рослина-індикатор				
	Petunia hybrida (Петунія)	Tropaeolum majus (Настурція)	*Datura stramonium (Дурман)*	*Phaseolus aerus (Квасоля)*	*Lycopersicon esculentum (Томат)*
ВОМ				+	+
ВЗКМО			+		
ВПЗТ	+	+			



А Б

Рис. 3. Детекція вірусів у рослинах *Colobanthus quitensis* за допомогою сендвіч ІФА (А) та за допомогою непрямого ІФА (В).

Отримані результати свідчать про наявність у даних рослинах атнигенів вірусів, що належать до різних таксономічних груп, а саме вірусів зеленої крапчатої мозаїки огірка (*Tobamovirus*), огіркової мозаїки (*Bromoviridae, Cucumovirus*) та плямистого в'янення томатів (*Bunyaviridae, Tospovirus*).

Вивчення інфекційності вірусів проводили на рослинах-індикаторах. Рослини були підібрані таким чином, щоб не давати перехресної реакції з кількома вірусами, а саме для ВОМ рослиною-індикатором є *Licopersicon esculentum* (томат), для ВПЗТ – *Tropaeolum majus* (настурція), а для ВЗКМО – *Datura stramonium* (дурман) (табл.1).

У досліді використовувались по 3 рослини для кожного зразка, де був виявлений антиген вірусу, та контрольні. Ураження проводили за допомогою механічної інокуляції листової пластинки гомогенатом з *D. antarctica*. Результати враховували на 14 день після ураження. Рослини показали симптоми, подібні до тих, що викликають модельні віруси (табл. 2.): *Lycopersicon esculentum* (томат) – мозаїка та карликовість з ниткоподібними листками в різних частинах, на *Phaseolus aureus* (квасоля) спостерігали маленькі пурпурні некротичні ураження на листках; у *Tropaeolum majus* (настурція) на 8–12 день після ураження проявилась системна

мозаїка у вигляді жовтих та темно-зелених плям, подекуди з локальними некрозами, що є типовими реакціями при ураженні ВОМ та ВПЗТ даних рослин-індикаторів відповідно. Позитивний результат спостерігався в усіх уражених рослинах порівняно з контрольними рослинами.

Таблиця 2

Симптоми на рослинах-індикаторах

Вірус	Рослина-індикатор				
	Petunia hybrida (Петунія)	*Tropaeolum majus (Настурція)*	*Datura stramonium (Дурман)*	*Phaseolus aerus (Квасоля)*	*Lycopersicon esculentum (Томат)*
ВОМ				некроз	мозаїка та карликовість
ВЗКМО			хлороз		
ВПЗТ	некроз	мозаїка			

У подальшому з використанням ІФА були проведені серологічні дослідження рослин-індикаторів, уражених інокулюмом з *Deschampsia antarctica*. Зразки аналізували на ІФА-рідері з використанням антисироваток до ВОМ, ВЗКМО, ВПЗТ. Позитивні результати були отримані до ВПЗТ та ВОМ (рис. 4).

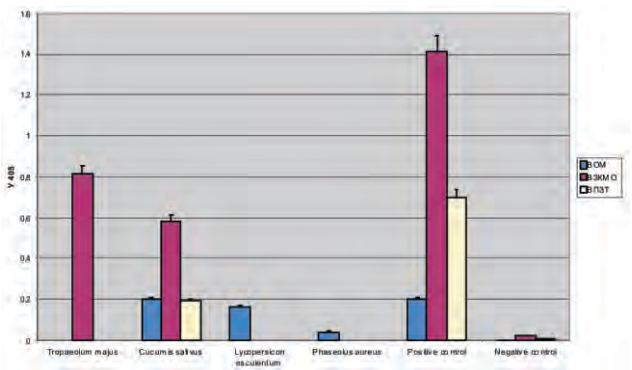


Рис. 4. Детекція ВОМ, ВЗКМО, ВПЗТ у рослинах *Lycopersicon esculentum*, *Phaseolus aureus, Tropaeolum majus, Cucumis sativus* методом непрямого ELISA.

Таким чином, у ході візуального спостереження та після аналізу даних ІФА було встановлено наступні закономірності. Серед рослин-індикаторів до ВПЗТ (настурція та огірок), ВОМ (томат, квасоля, огірок), ВЗКМО (огірок), уражених витяжкою з Deschampsia antarctica, лише настурція дала чіткі симптоми у вигляді системної мозаїки (жовтої та темно-зеленої плямистості). Наявність антигену ВПЗТ було підтверджено за допомогою ІФА. Наявність антигену ВПЗТ показала й інша рослина-індикатор, а саме огірок, який у свою чергу дав позитивний результат і на інші віруси – ВЗКМО та ВОМ. Нам не вдалося розділити всі три віруси, однак вдалося відокремити за попередніми даними один – ВПЗТ.

Отже, за отриманими результатами можемо говорити про наявність у рослинах *Deshamcia antarctica* та *Colobanthus quitensis* вірусних антигенів, що належать до різних таксономічних груп: *Cucumovirus, Tobamovirus, Tospovirus*. Що стосується судинної рослини з Аргентинського архіпелагу – *C. quitensis*, то за результатами ІФА можна говорити про

наявність у цій рослині тільки антигенів ВЗКМО. Подальша робота щодо виявлення вірусів рослин в Антарктиді буде зосереджена на молекулярно-біологічних методах діагностики вірусів.

Автори висловлюють подяку Національному антарктичному науковому центру Державного комітету України з питань науки, інновацій та інформатизації за підтримку під час збору, транспортування та аналізу використаних в експериментах зразків.

Список літератури

Amy M. Treonis and Diana H. Wall. Invertebrate diversity in Taylor Valley soils and sediments// Antarctic Journal of the United States, 2001.

David A. Pearce and William H. Wilson. Viruses in Antarctic ecosystems// Antarctic Science 15 (3): 319–331 (2003).

B.V. Sneddon. The taxonomy and breeding system of Colobanthus squarrosus (Caryophyllaceae) // New Zealand Journal of Botany, 1999.

Rolf Holderegger, Ivana Stehlik. Populations of Antarctic Hairgrass (Deschampsia antarctica) Show Low Genetic Diversity // Arctic, Antarctic, and Alpine Research, Vol. 35, No. 2, 2003.

Miren Alberdia, Leyn A. Bravob, Ana Gutiйrrezc, Manuel Gidekelc and Luis J. Corcuerab. Ecophysiology of Antarctic vascular plants// PHYSIOLOGIA PLANTARUM 115: 479–486, 2002.

Skotsnicki M.L, Selkirk P.M, Kitajima E. et al. The first subantarctic plant virus report: stilbocarpa mosaic bacilliform badnavirus from Macquarie island// Polar Biology. – 2003. – P. 1–7.

Moss S.R., Ayres C.M. and Nuttall P.A. The Great Island subgroup of tick-borne orbiviruses represents a single gene pool // Journal of General Virology. – 1988. – Vol. 69. – P. 2721–2727.

Rogers S.O., Theraisnathan V., Ma Y., Zhao L.J., Zhang G., Shin S.-G., Castello J. D., and Starmer W.T. Comparisons of Protocols for Decontamination of Environmental Ice Samples for Biological and Molecular Examinations // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70. – No. 4. – P. 2540–2544.

Steven M. Short and Curtis A. Suttle. Sequence Analysis of Marine Virus Communities Reveals that Groups of Related Algal Viruses are Widely Distributed in Nature // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68. – No. 3. – P. 1290–1296.

Warshauer D.M., Dick E.C., Mandel A.D., Flynn T.C. and Jerde R.S. Rhinovirus infections in an isolated antarctic station. Transmission of the viruses and susceptibility of the population // American Journal of Epidemiology. – 1989. – Vol. 129. – P. 319–340.

Лакин Г.Ф. Биометрия / М.: Высшая школа. – 1980. – 293 с.

ELISA: Theory and practice / by John Crowler, – 1995. – P. 115 – 120.